

总胆固醇（TC）含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1985

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	自备试剂	-
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 400 μL×1 支	2-8℃保存
试剂三	液体 60 μL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	粉剂×1 支	2-8℃保存

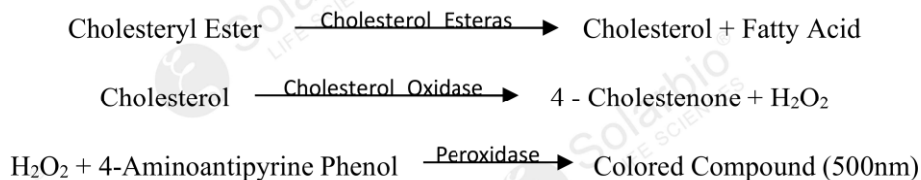
溶液的配制：

1. 提取液：自备异丙醇，大约需要 110mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。
2. 试剂三：液体置于试剂瓶内 EP 管中，用前使用掌上离心机将液体甩离至底部。
3. 标准品：10 mg 胆固醇，临用前加入 517 μL 提取液，振荡溶解，即为 50 μmol/mL 的胆固醇标准品，2-8℃可保存 4 周。
4. 工作液的配制：根据样本量按试剂一：试剂二：试剂三=6 mL：40 μL：6 μL（共 6.046mL，约 12T）的比例配制工作液，现用现配。

产品说明：

总胆固醇（Total Cholesterol, TC）是指所有脂蛋白所含胆固醇的总和，包括游离胆固醇和胆固醇酯。

利用酯酶催化胆固醇酯水解生成游离胆固醇（FC）和游离脂肪酸（FFA），从而把胆固醇酯转化为FC；进一步利用胆固醇氧化酶催化FC氧化，生成4-胆甾烯酮和H₂O₂；最后利用过氧化物酶催化H₂O₂氧化4-氨基安替比林和酚，生成红色醌类化合物，其在500nm有特征吸收峰，其颜色深浅与TC含量成正比。



技术指标：

最低检出限：0.02 μmol/mL

线性范围：0.03-15 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。





需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、天平、低温台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、EP管、冰、蒸馏水、异丙醇（AR，98%）。

操作步骤:

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆。10000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
2. 细菌/细胞：按照细菌/细胞数量（10⁶ 个）：提取液体积（mL）为 5~10：1 的比例（建议 5×10⁶ 万细菌/细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细菌/细胞（功率 300w，超声 2 秒，间隔 3 秒，总时间 3min）；然后 10000g，4℃离心 10min，取上清置于冰上待测。
3. 血清（浆）等液体样本：直接测定。若有沉淀请离心后取上清待测。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至500nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 工作液临用前37℃预热10min以上。
3. 标准品的稀释：将50μmol/mL胆固醇标准品用提取液进行稀释得到10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125μmol/mL的标准品备用。
4. 标准品稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（μmol/mL）	标准品体积（μL）	提取液体积（μL）	稀释后浓度（μmol/mL）
1	50	100	400	10
2	10	200	200	5
3	5	200	200	2.5
4	2.5	200	200	1.25
5	1.25	200	200	0.625
6	0.625	200	200	0.3125

备注：下述实验中每个标准管需10μL标准品（注意不要在此步骤直接检测吸光度）。

5. 在1.5mLEP管按下表步骤加样：

试剂名称（μL）	测定管	标准管	空白管
样本	10	-	-
标准品	-	10	-
提取液	-	-	10
工作液	500	500	500

充分混匀，37℃静置 30min，反应完成后吸取 200μL 于微量比色皿/96 孔板中，500nm 处测定吸光值 A，分别记为 A 测定、A 标准和 A 空白，ΔA 测定=A 测定-A 空白，ΔA 标准=A 标准-A 空白。空白管和标准曲线只需测 1-2 次。

注：若样本为血清（浆）等液体样本，则需要增加‘血清（浆）空白管’-即将空白管中的提取液（异丙醇）更换为蒸馏水进行实验，计算ΔA 测定=A 测定-A 血清（浆）空白，标准管测定及ΔA 标准计算不变。



三、总胆固醇含量计算

1. 标准曲线的绘制:

根据标准管的浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$) 和吸光度 ΔA 标准 (y , ΔA 标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 测定 (y , ΔA 测定) 带入公式计算样本浓度 (x , $\mu\text{mol/mL}$)。

2. 总胆固醇含量的计算:

(1) 按血清 (浆) 等液体体积计算: $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol/dL}) = x \times 100 \times F$

(2) 按样本蛋白浓度计算: $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = x \times V_{\text{提取}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{提取}} \times F) = x \div C_{\text{pr}} \times F$

(3) 按样本质量计算: $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{提取}} \div W \times F = x \div W \times F$

(4) 按细胞/细菌数量计算: $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{提取}} \div N \times F = x \div N \times F$

100: 单位换算系数, $1\text{dL}=100\text{mL}$; $V_{\text{提取}}$: 加入样本的提取液体积, 1mL ; W : 样本质量, g ; N : 细胞/细菌总数, 以 10^6 计; C_{pr} : 蛋白浓度, mg/mL ; F : 样本稀释倍数。

注意事项:

- 如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者用提取液稀释样本 (血清 (浆) 用蒸馏水稀释) 后再进行测定。注意同步修改计算公式。
- 提取液中含有使蛋白变性的成分, 故按蛋白浓度计算时需要重新提取蛋白进行测定。
- 若细胞测定数值较小, 可修改样本量和工作液的比例, 如改为 $20+490$ (稀释倍速为 0.5), $50+460$ (稀释倍数为 0.2) 或者样本量提至更高体积。

实验实例:

- 取 0.105g 大鼠肾脏加入 1mL 提取液冰浴匀浆, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.124 - 0.044 = 0.080$, 根据标准曲线 $y = 0.066 - 0.0069x$, $R^2 = 0.9991$, 计算 $x = 1.317$, 按样本质量计算含量得:
 $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol/g 质量}) = x \div W = 12.543 \mu\text{mol/g 质量}$ 。
- 取 10×10^6 个 HeLa 细胞加入 0.5mL 提取液超声破碎, 按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.071 - 0.044 = 0.027$, 根据标准曲线 $y = 0.066 - 0.0069x$, $R^2 = 0.9991$, 计算 $x = 0.514$, 按细胞数量计算含量得:
 $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) = x \times V_{\text{提取}} \div N \times F = 0.026 \mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}$ 。
- 取大鼠血清样本, 直接按照测定步骤操作, 使用 96 孔板测得 ΔA 测定 = A 测定 - A 空白 = $0.177 - 0.044 = 0.133$, 根据标准曲线 $y = 0.066 - 0.0069x$, $R^2 = 0.9991$, 计算 $x = 2.120$, 按血清 (浆) 等液体体积计算含量得:
 $\text{TC 含量 } (\mu\text{mol/dL}) = x \times 100 = 212.0 \mu\text{mol/dL}$ 。

相关发表文献:

[1] Wang P, Li M, Gao T, Fan J, Zhang D, Zhao Y, Zhao Y, Wang Y, Guo T, Gao X, Liu Y, Gao Y, Guan X, Sun X, Zhao J, Li H, Yang L. Vascular Electrical Stimulation with Wireless, Battery-Free, and Fully Implantable Features Reduces Atherosclerotic Plaque Formation Through Sirt1-Mediated Autophagy. *Small*. 2023 Oct;19(40):e2300584. doi: 10.1002/sml.202300584. Epub 2023 Jun 2. PMID: 37267941.

[2] Hu C, Xin Z, Sun X, Hu Y, Zhang C, Yan R, Wang Y, Lu M, Huang J, Du X, Xing B, Liu X. Activation of ACLY by SEC63 deploys metabolic reprogramming to facilitate hepatocellular carcinoma metastasis upon endoplasmic reticulum





stress. J Exp Clin Cancer Res. 2023 May 1;42(1):108. doi: 10.1186/s13046-023-02656-7. PMID: 37122003; PMCID: PMC10150531.

[3] Zhu Y, Jia Y, Wang X, Yi S, Li Y, Zhong W, Zhu L. Mechanisms Underlying the Impacts of Lipids on the Diverse Bioavailability of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Foods. Environ Sci Technol. 2022 Mar 15;56(6):3613-3622. doi: 10.1021/acs.est.1c06461. Epub 2022 Feb 23. PMID: 35195405.

[4] Liu D, Rong H, Chen Y, Wang Q, Qian S, Ji Y, Yao W, Yin J, Gao X. Targeted disruption of mitochondria potentially reverses multidrug resistance in cancer therapy. Br J Pharmacol. 2022 Jul;179(13):3346-3362. doi: 10.1111/bph.15801. Epub 2022 Feb 15. PMID: 35040123.

参考文献:

[1] Rautela GS, Liedtke RJ. Automated enzymic measurement of total cholesterol in serum[J]. Clinical Chemistry, 1978, 24(1): 108-114.

[2] Otani T, Ishimaru K, Nakamura S. et al. Determination of total and free cholesterol by using cholesterol oxidase from Streptomyces [J]. Chemical & pharmaceutical bulletin, 1977, 25(6): 1452-1455.

相关系列产品:

BC1890/BC1895 游离胆固醇 (FC) 含量检测试剂盒

BC0590/BC0595 游离脂肪酸 (FFA) 含量检测试剂盒

BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶 (ALDH) 活性检测试剂盒

